云 南 植 物 研 究 2009, 31 (5): 415～420
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.09175

叶绿体分裂相关蛋白 CrMinD 的保守功能

雷启义, 周江菊, 张文华
(凯里学院环境与生命科学学院, 贵州 凯里 556000)

摘要: 细胞或质体中部正确分裂位点的选择是 MinD 蛋白与其他 Min 蛋白 (MinC E) 相互作用的结果, MinD 蛋白在原核细胞以及植物叶绿体的分裂过程中发挥着重要的作用。细胞中 MinD 蛋白浓度的明显升高可影响正常细胞的分裂过程而产生丝状体细胞。为了研究叶绿体分裂蛋白 CrMinD 的保守功能, 构建了衣藻 *CrMinD-gfp* 的原核表达重组质粒进行了原核功能验证。试验结果表明, 衣藻 CrMinD 蛋白的过量表达严重影响了大肠杆菌的分裂, 其在原核细胞中运动和定位与用 GFP 标记的原核细胞 MinD 蛋白具有相似性。更进一步证明了叶绿体分裂同源物 CrMinD 蛋白与原核细胞 MinD 蛋白有着相似的功能, 是一个进化上功能保守的蛋白。同时, 这一结果也为研究植物细胞中质体的分裂机制奠定了一定的基础。

关键词: 叶绿体; MinD 蛋白; 基因表达; 细胞分裂
中图分类号: Q 71 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2009) 05-415-06

The Conservative Function of Chloroplast Division Associated CrMinD Protein

LEI Qi-Yi, ZHOU Jiang-Ju, ZHANG Wen-Hua
(*College of Life and Environment Science*, *Kaili University*, Kaili 556000, China)

Abstract: The interacting of MinD and MinC and MinE proteins of *Escherichia coli* are required for proper placement of the division septum at midcell, The MinD protein plays a key role in the course of bacterial cell and plant chloroplast division. The over production of MinD protein can block the normal cell division and lead to a filamentation cell. In plant cells, There are clear similarities between bacterial and plastid division, but limited information exists regarding the mechanism of plastid division in higher plants. Here we constructed a expression plasmid encoding the full-length CrMinD, an *Chlamydomonas reinhardtii* homologue of the bacterial MinD. In agreement with cell division studies in bacteria over expression of CrMinD in *E. coli* results in filamentation cell formation. The sesuggestion that CrMinD is an evolutionary conserved cell division protein. Meanwhile, the result lays a certain foundation for studying on the division mechanism of plant chloroplast.

Key words: Chloroplast; MinD protein; Gene expression; Cell division

质体作为植物细胞器的基本组成部分对于地球上的生命是至关重要的, 它们除了从预存的质体一分为二分裂产生外不能再生 (Possingham and Saurer, 1996; Boasson, 1972; Platt-Aloia and Thomson, 1977), 因此, 质体的分裂对于质体的总体维持和累积是非常重要的。目前的研究表明, 细菌和叶绿体起源的蓝细菌的与质体分裂相关的许多蛋白具有同源性, 包括 FtsZ 蛋白和 Min 蛋白等 (de Boer PA and Crossley, 1989; Colletti 等, 2000; Itoh 等, 2001; Maple 等, 2002; Osteryoung and Vierling, 1995; Pichoff and Lutkenhaus, 2001) 。FtsZ 蛋白是一种具有 GTP 酶活性的微管

基金项目: 贵州省凯里学院植物学重点学科基金资助 (2008ZW002)
收稿日期: 2009-09-07, 2009-09-16 接受发表
作者简介: 雷启义, 男, 副教授, 研究生, 植物分子细胞生物学。E-mail: leiqiyi@126.com; Tel: 0855-8509951

相似蛋白，在正常细胞分裂中，FtsZ 蛋白在细胞中部聚合形成“Z”形环状骨架结构，其它分裂相关蛋白再与“Z”环相结合而导致分裂事件的发生（Osteryoung and Vierling，1995）。“Z”形环在质体中部的形成与正确定位要通过起源于原核的 Min 蛋白来调控，Min 蛋白——MinC、MinD、MinE 蛋白在细胞分裂位点的选择与确定中起着非常重要的作用（de Boer and Crossley，1989；de Boer 等，1992；Rothfield 等，1999；Rothfield 等，2001；Rothfield 等，2005）。原核细胞存在三个潜在的分裂位，一个在中部，另外两个分别靠近细胞的端部（或称极部），在这些 Min 蛋白中，当 minD 基因突变或过量表达时，“Z”环不能正确定位于细胞中部潜在的分裂位点，从而导致细胞分裂异常，产生不含基因组的小细（Mincell）或长丝状细胞（filamentation cell）（Erickson，1997；Rothfield 等，1999）。

最近 10 年的研究成果表明，质体分裂是一个高度集成的多蛋白参与的过程，包括原核起源的蛋白以及真核寄主起源的蛋白。然而，各种不同来源的蛋白在质体分裂过程中相互作用的机制直到最近才有所阐述（李大鹏等，2009）。植物叶绿体为内共生起源，目前对高等植物核基因组中研究中也发现了 *ftsZ*、*minD* 同源基因（Colletti 等，2000；Fujiwara 等，2004；Maple and Chua，2002；Pichoff and Lutkenhaus，2001；Wang 等，2003），植物细胞中内共生起源的叶绿体仍然利用 FtsZ 蛋白进行分裂，干扰拟南芥 *ftsZ*、*minD* 基因以及衣藻 *CrMinD*1 基因的过量表达均会导致叶绿体分裂出现异常表型，说明了高等植物质体与细菌的分裂仍然具有相似的遗传基础和分裂机制（Adams 等，2008；胡勇等，2004；Kanamaru 等，2000；Osteryoung and Vierling，1995；Osteryoung and Pyke，1998；Steryoung and Nunnari，2003）。

衣藻属于单细胞绿藻，其仅含有单一的体积较大的杯状叶绿体，这种叶绿体在衣藻细胞质分裂时其子细胞中都分布。衣藻细胞分裂具有多重性，有证据表明在衣藻第二和第三轮分裂过程中（在四分裂或八分裂细胞中），叶绿体的分裂先于细胞分裂（Harper and John，1986）[26]。衣藻和拟南芥质体共同内共生起源和质体分裂的类似物的存在，表明了衣藻叶绿体分裂与高等植物叶绿体分裂机制具有相似性（Adams 等，2008）。然而，以往的研究仅仅局限于单细胞衣藻质体分裂 MinD 类似物对细胞形态的影响（Adams 等，2008），而关于衣藻质体分裂 MinD 类似物原核功能验证没有做全面工作，为此，我们研究组利用衣藻质叶绿体分裂相关基因 *MinD* 类似物构建融合表达载体进行研究，全面证明了衣藻叶绿体分裂基因 *MinD* 类似物是一个功能非常保守的蛋白，这为进一步研究高等叶绿体的分裂及其调控机制奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 JM109 由本室保存，限制性内切酶 *Hind*III、*Bam*HI 以及 Taq 酶购于 TaKaRa 大连公司，T4DNA 连接酶购自华美公司，DNA 序列测定由上海联合基因公司完成。PCR 引物由上海生工公司合成，dNTP 与 DNA 电泳凝胶回收试剂盒购自上海生工公司，其他试剂及培养基购自华美、生工、Promega、鼎国等公司。CrMinD 蛋白抗血清由本实验室制备，羊抗鼠 IgG 购自北京中山生物技术公司。

1.2 衣藻 *CrminD* 基因的克隆以及 CrminD-egfp 融合表达载体的构建

衣藻 *CrminD* 基因的克隆以及其融合表达载体的构建按照文献（胡勇等，2004；Hu 等，2008）的方法进行。扩增 CrMinD cDNA 并将其纯化后，克隆到 *Hind*III + *Bam*HI 双酶切的 pEGFP 载体上，转化 JM109 感受态菌，在选择培养基上筛选阳性转化子命名为 pHMinD-gfp，并进行 DNA 序列测定和酶切鉴定。

1.3 CrMinD 蛋白在 *E. coli* 中的定位与观察

将以酶切鉴定正确的转化有融合表达质粒 pHMinD-gfp 的大肠杆菌 JM109 在选择培养基上划板（含氨苄青霉素 80 μg ml^{-1}）培养后，挑取含重组载体的单个菌落于液体培养基中（含氨苄青霉素 80 μg ml^{-1}）37℃摇培过夜，次日以 1 50 比例取过夜培养物分别接种于含有 0、25、50、100、200、400、800、1 000、1 200、1 400 μmol L^{-1} 不同 IPTG 浓度的 LB 液体培养基中（含氨苄青霉素 80 μg ml^{-1}），在 37℃恒温培养箱摇培诱导 4 小时；与此同时将对照组（野生大肠杆菌 JM109 和转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌）做同样的处理。把以上培养物与等体积预热的 0.5%低熔点琼脂糖充分混匀后涂于无荧光载片上，压片后采用蓝光激发和标准滤光片进行镜检和统计。

利用 Leica DMRE 型多功能显微镜微分干涉系统对在不同 IPTG 浓度诱导下的转化有融合表达质粒的 JM109 的菌体和对照组菌体的形态以及荧光情况进行观测，并用

Spot cold CCD Digital camera 采集图象；再利用 Leica TCS 激光共聚焦显微镜对转化有融合表达质粒的 JM109 的菌体形态以及 GFP 来源的荧光定位进行实时观察，所用物镜为 Leica 100x，激发 GFP 产生荧光的激发光波长为 488 nm，图像的采集处理用 Leica TCS PowerScan 软件。

1.4　CrMinD 蛋白 Western blot 检测

取检测到 CrMinD 融合蛋白在细胞中动态定位的诱导培养菌和对照菌各 1.5 ml 于离心管，离心后分别加入蛋白提取液，蛋白质经定量后，取 60 μg 样本进行 SDS-PAGE 电泳，标明 1、2、3、4 泳道，100 V 电泳 2 h，然后转印蛋白质到 NC 膜上放入 TBST 脱脂奶粉封闭液中(电压 24 V，50 min)，37℃孵育 2 h，PBS 室温振摇洗膜 3 次，每次 5 min。一抗 (1∶500) 4℃过夜，相应二抗 (1∶3000) 37℃孵育 2 h，PBS 洗膜 3 次，每次 5 min，ECL 化学发光，观察结果。

2　结果

2.1　目的基因 *CrminD* 的扩增

以 *CrminD* 基因 cDNA 为模板进行 PCR 扩增并做琼脂糖凝胶电泳分析。结果证明，扩增产物为 1.7 kb 大小的 DNA 带，与衣藻 CrMinD 全长的大小相吻，鉴定结果见图 1A。

2.2　pHMinD-gfp 重组质粒的鉴酶切定

重组质粒经 *Hind*III + *BamH*I 双酶切后鉴定产生 1.7 kb 大小的 DNA 带和约 4 kb 的质粒带，与目的基因 *CrMinD* 全长和原质粒的大小相一致。最后的 DNA 测序结果证明 *CrMinD* 基因序列没有突变的出现，而且整个重组质粒 pHMinD-gfp 的读码框也是正确的，酶切鉴定结果见图 1B。

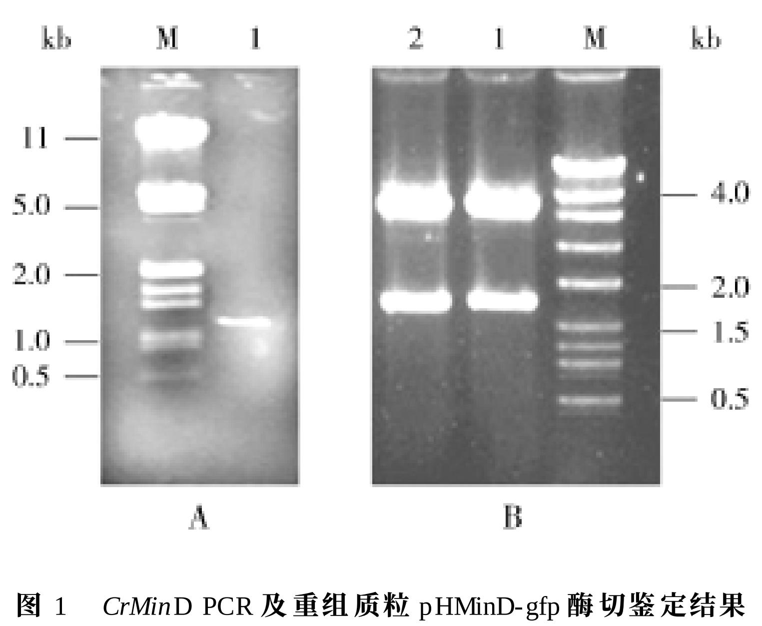


图 1　*CrMin*D PCR 及重组质粒 pHMinD-gfp 酶切鉴定结果

A . M 为分子标记；1 . 基因 CrMinD PCR 电泳图；B . M 为分子标记；1、2 . 质粒 pHMinD-gfp *Hind*III + *BamH*I 双酶切电泳图

Fig . 2　Agarose gel electrophoresis of *CrMinD* PCR prouduct and pHMinD-gfp digested

A . M . marker; 1 . PCR product of gene *CrMin*; B . M . marker; 1, 2 . pHMinD-gfp *Hind*III + *BamH*I digested

2.3　CrMinD 对原核细胞形态的影响及在其中的定位

通过上述的实验方法，利用显微镜观察发现，作为对照组的野生型大肠杆菌和转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌在一系列的诱导条件中菌体长度 (2～6 μm) 没有发生明显的变化，细胞的分裂几乎都发生在正常的分裂位点 (细胞中部) (图 2：A，B)；在 IPTG 的诱导下，转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌 (对照菌)，其细胞的形态和大小与野生型大肠杆菌相似 (图 2：C)，荧光观察可见 GFP 蛋白分子分布于整个细菌细胞中 (图 2：D)，而且仍然能进行正常的生命活动，说明 pEGFP 质粒并没有影响空宿主菌的生长也没有影响其正常的生命活动。含有 pHMinD-gfp 质粒的宿主细胞，随着 IPTG 浓度的增加，诱导培养的细菌细胞出现了明显的不对称分裂 (图 3：A，B 白色箭头示分裂位点)，而且细胞长度明显变长 (图 3：A，B，C)，有的细胞长达 20 μm (图 3：B)，菌体长度呈现规律性的变化。对每种诱导浓度，随机测量 200 个菌的长度并进行单因子方差统计分析 (图 5) 也证明了这一现象；在 1 $\mu mol\ L^{-1}$ IPTG 浓度培养的含有 pHMinD-gfp 质粒的宿主细胞可见 CrMinD 融合蛋白在细胞中定位 (图 3：D)，通过共聚焦显微镜观察，可见 CrMinD 融合蛋白在细胞中快速往返式的螺旋运动情况 (图 4) 并影响细胞的分裂。

2.4　CrMinD 蛋白 Western blot 检测结果

Western blot 结果显示，在泳道 1 (野生大肠杆菌) 和泳道 2 (转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌) 未出现反应，而含 pHMinD-gfp 重组质粒的大肠杆菌经 IPTG 诱导后在泳道 3 和 4 上相应于其表达产物相对分子量的地方出现了目的条带 (图 6)。

3　讨论与结论

最近的研究表明，植物质体的分裂是通过多种具有保守性的质体分裂蛋白相互作用来确保植物质体的正常分裂，这种相互作用直接影响了质体分裂蛋白的定位及功能的发挥。为此，人们在质体分裂研究中，主要研究各种已知或新发现蛋

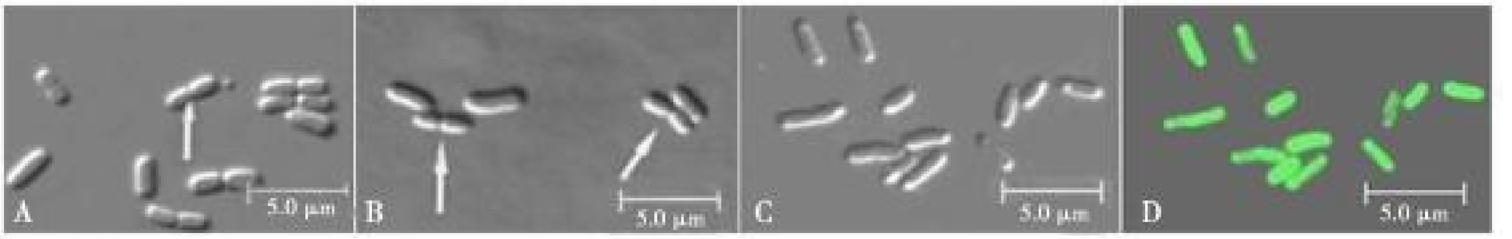


图 2　野生大肠杆菌 JM109 和转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌菌体表型 (对照)

A . *E. coli* JM109 无 IPTG 诱导; B . *E. coli* JM109 用 1 000 μmol L^{-1} IPTG 诱导; C . 转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌用 1 000 μmol L^{-1} IPTG 诱导; D . 转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌用 1 000 μmol L^{-1} IPTG 诱导荧光对照图

Fig . 2　The morphology of wild *E. coli* JM109 and empty host *E. coli* that contain pEGFP plasmids (contrast)

A . without IPTG induction; B . with 1 000 μmol L^{-1} IPTG induction for 4 h; C . empty host *E. coli* that contain pEGFP plasmids with 1 000 μmol L^{-1} IPTG induction for 4 h; D . the picture of gfp contrast of Fig C

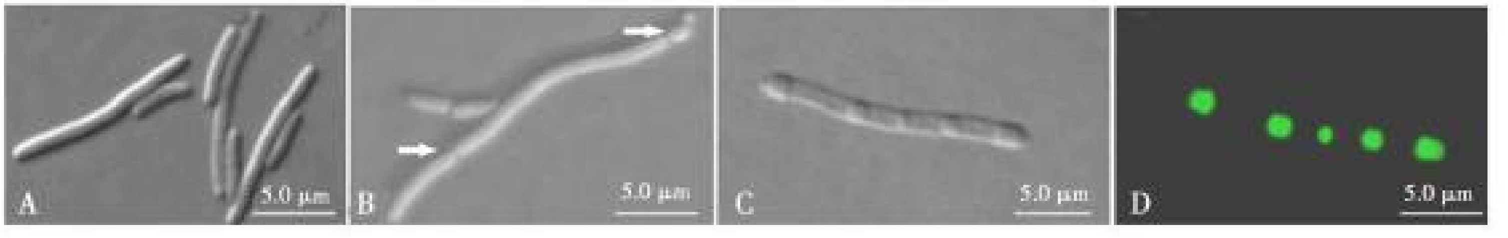


图 3　*CrMinD* 基因在大肠杆菌细胞中表达及对细胞形态的影响

A . 含 pHMinD-gfp 重组质粒的大肠杆菌经 1 000 μmol L^{-1} IPTG 诱导细胞形态; B . 丝状体细胞不对称分裂 (白色箭头示分裂位点); C, D . 示 CrMinD 蛋白在大肠杆菌细胞中的定位

Fig . 3　Expressions of *CrMinD* in *E. coli* and effect on morphology of host cell

A . the morphology of host cell contain pHMinD-gfp plasmids with 1 000 μmol L^{-1} IPTG induction for 4 h; B . asymmetric division of filamentous cell (the white arrows indicate the cell division site); C and D . the orientation of CrMinD in *E. coli*

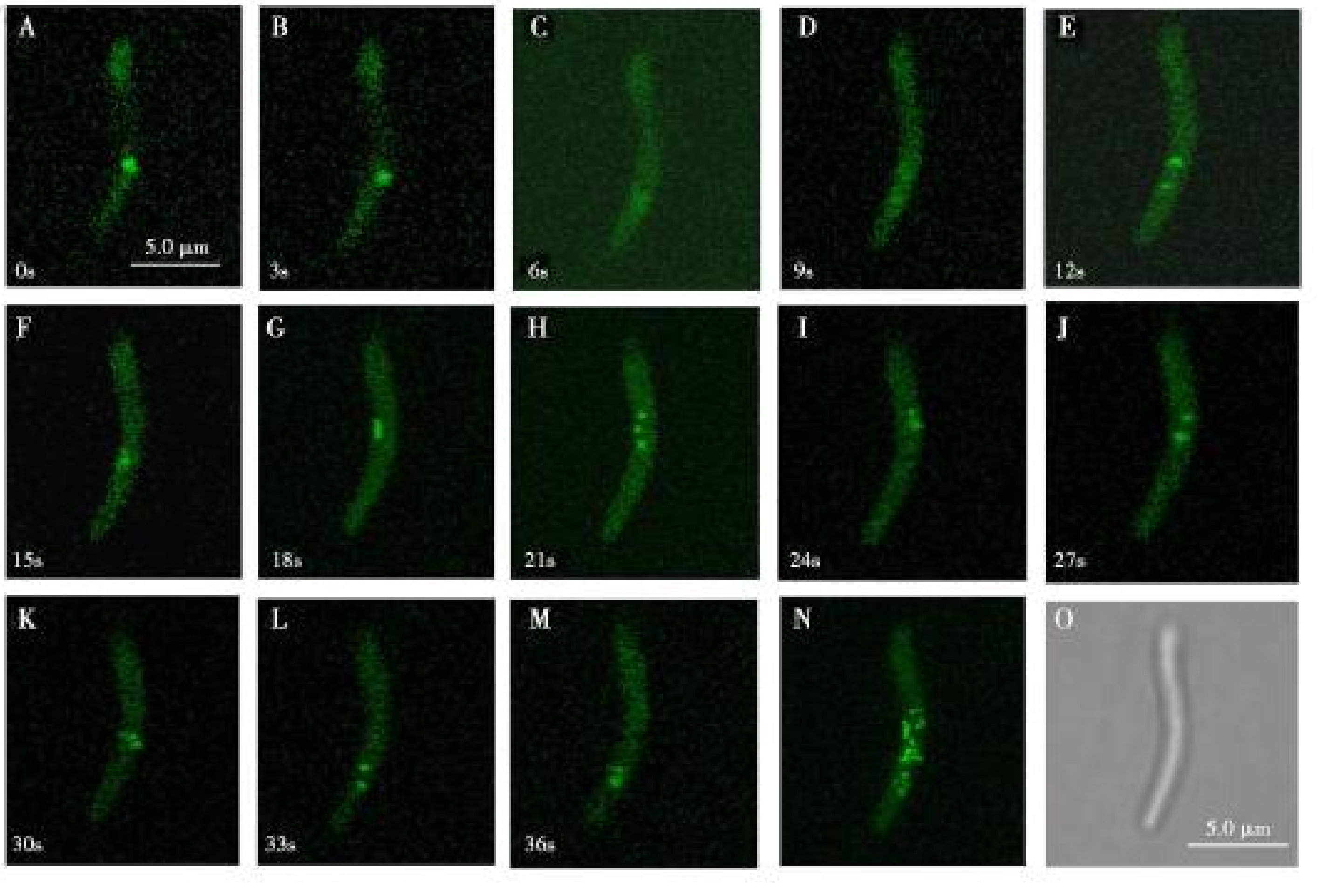


图 4　CrMinD 蛋白沿着大肠杆菌细胞长轴螺旋式运动

A-M . CrMinD 蛋白在大肠杆菌细胞中的螺旋式运动过程; N . 激光扫描共聚集三维重组图; O . 同一视野中大肠杆菌对照图

Fig . 4　The helix movement of CrMinD protein around the long axis of *E. coli* cell

A-M . the course of CrMinD protein around the long axis of *E. coli* cell; N . the three-dimensional representation of laser scanning confocal; O . the contrast image of *E. coli* cell in same visual field

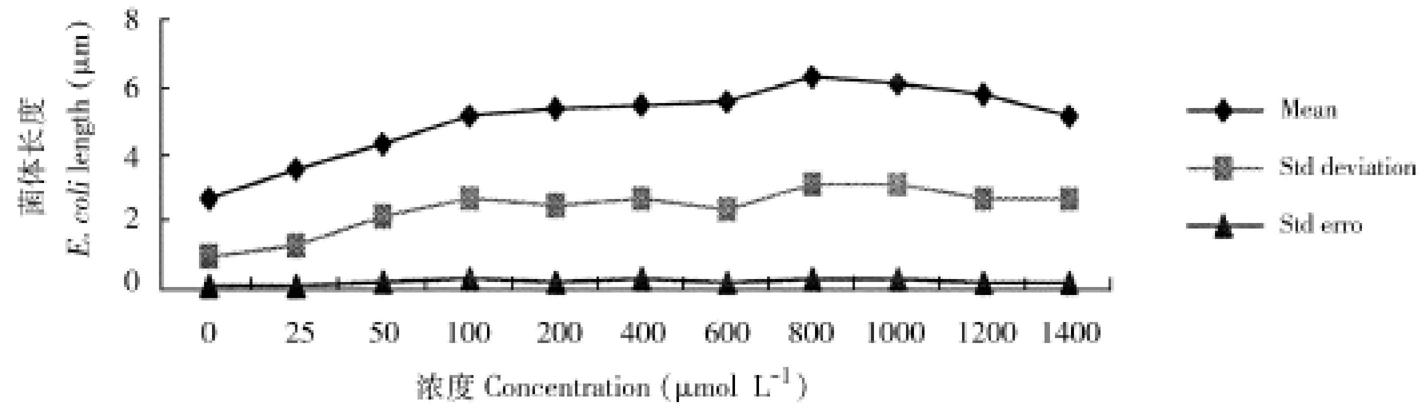


图 5 转化 pHMinD-gfp 质粒菌体长度变化统计图

Fig . 5 Statistical Fig of length changes of *E. coli* contain pHMinD-gfp plasmids

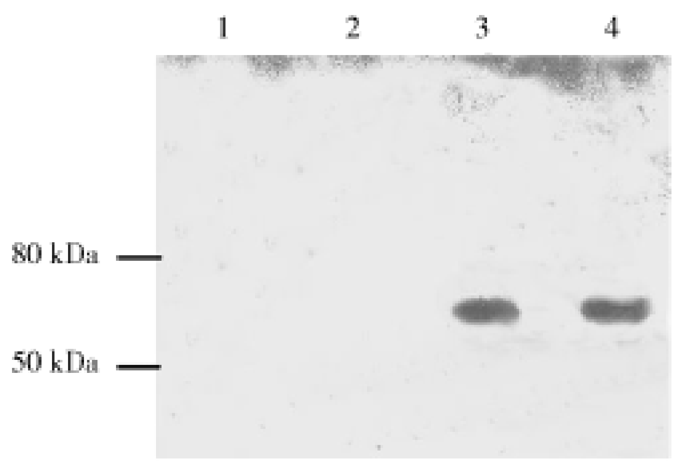


图 6 CrMinD 蛋白 Western blot 检测

1 . 野生大肠杆菌 JM109；2 . 转化有 pEGFP 质粒的空宿主菌；3、4 . 经 IPTG 诱导的含 pHMinD-gfp 重组质粒的大肠杆菌

Fig . 6 Western blot analysis of CrMinD protein

Lane 1: wild *E. coli* JM109; Lane 2: empty host *E. coli* that contain pEGFP plasmids; Lane 3 and lane 4: *E. coli* that contain pHMinD-gfp plasmids with 1 000 μmol L^{-1} IPTG induction

白的亚细胞定位以及与其它蛋白间的相互作用(李大鹏等，2009)，通过此途径来认识植物质体的分裂机制。

衣藻是一种单细胞绿色藻类，其世系分支于 10 多亿年前的陆生植物，其已经成为研究叶绿体光合作用的一个模型体系（Merchant 等，2007)。为了研究植物叶绿体分裂相关蛋白——Min 蛋白的功能及叶绿体的分裂机制，我们将来源于衣藻的 *CrMinD* 基因构建成原核表达质粒，转化大肠杆菌并对其功能进行分析研究。通过研究发现，转化有 *CrMinD* 基因的原核细胞在 IPTG 的诱导下，能特异地表达，细胞分裂出现了异常现象，大多数细胞的分裂位点发生在细胞的端部(极部)，有的细胞分裂受阻逐渐变长而呈现了丝状体细胞表型，随着 IPTG 的诱导浓度的增加，菌体长度也呈现规律性的变化，而对照组细菌细胞没有此现象发生，衣藻 CrMinD 蛋白对原核细胞形态的影响类似于原核细胞内源 MinD 蛋白作用（Pichoff and Lutkenhaus，2001；Shih 等，2003)，说明了衣藻 CrMinD 蛋白功能具有同样的保守性。荧光观察可见 CrMinD-EGFP 融合蛋白在分裂受阻的丝状体细胞中形成环状物（MinD 环）并呈均匀分布，且相邻环的间距也在 2～6 μm，这与野生大肠杆菌的细胞长度接近吻合，我们认为这些点是细胞的分裂位点因 CrMinD-EGFP 融合蛋白过量表达聚合而被屏蔽所致。在实验中，我们观察到衣藻 CrMinD 蛋白，快速地从转化菌长丝状细胞的一端（极）绕着细胞长轴地移动到另一端(极)，呈现出明显螺旋式运动（图 4)，这也与绿色荧光标记的大肠杆菌内源性 MinD 蛋白运动相似（Shih 等，2003)，通过 Western blot 检测证实了观察到蛋白为目的蛋白。以上实验结果说明，衣藻 CrMinD 蛋白在大肠杆菌细胞中仍然能够调控细胞的分裂活动，是功能非常保守的蛋白，也说明植物中叶绿体具有与细菌细胞相似的分裂调控机制，更进一步验证了衣藻 CrMinD 蛋白的保守功能，这为进一步研究植物叶绿体的分裂机制奠定了一定的基础。

〔参 考 文 献〕

Adams S, Maple J, Moller SG, 2008 . Functional conservation of the MIN plastid division homologues of *Chlamydomonas reinhardtii* [J] . *Plant*, 227 (6): 1199—1211

Boasson R, Laetsch WH, Price I, 1972 . The etioplast chloroplast transformation in tobacco: Correlation of ultrastructure, replication and chlorophyll synthesis [J] . *American Journal of Botany*, 59: 217—233

Colletti KS, Tattersall EA, Pyke KA *et al.*, 2000 . A homologue of the

bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus [J]. *Current Biology*, 10: 507—516

de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI, 1989. A division inhibitor and atopological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli* [J]. *Cell*, 56 (4): 641—649

de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI, 1992. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE systemof *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 174 (1): 63—70

Erickson HP, 1997. FtsZ a tubulin homologue in prokaryote cell division [J]. *Trends Cess Biology*, 7: 362—367

Fujiwara MT, Nakamura A, Itoh R *et al.*, 2004. Chloroplast division site placement requires dimerization of the ARC11 AtMinD1 protein in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Cell Science*, 117: 2399—2410

Harper JDI, John PCL, 1986. Coordination of division events in the *Chlamydomonas* cells cycle [J]. *Protoplasma*, 131: 118—130

Hu Y, Chen ZW, Liu WZ *et al.*, 2008. Chloroplast division regulated by the circadian expression of FtsZ and Min genes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *European Journal of Phycology*, 43 (2): 207—215

Hu Y (**胡勇**), Kong DD (**孔东东**), He YK (**何奕昆**), 2004. On-line cloning and evolution analysis of crmind gene from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* (**水生生物学报**), 28 (1): 106—109

Itoh R, Fujiwara M, Nagata N *et al.*, 2001. A chloroplast protein homologous to the eubacterial topological specity factor MinE plays a role in chloroplast division [J]. *Plant Physiology*, 127 (4): 1644—1655

Kanamaru K, Fujiware M, Kim M *et al.*, 2000. Chloroplast targeting distribution and transcription fluctuation of AtMinD1, a eubacteria-type factor critical for chloroplast division [J]. *Plant and Cell Physiology*, 41 (10): 1119—1128

Li DP (**李大鹏**), Zhang M (**张敏**), Gao Q (**高潜**) *et al.*, 2009. Yikun He. An emerging picture of plastid division in higher plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (**植物学报**), 44 (1): 43—51

Maple J, Chua NH, Moller SG, 2002. The topological specificity factor AtMinE1 is essential for correct plastid division site placement in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 31 (3): 269—277

Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O *et al.*, 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions [J]. *Science*, 318 (5848): 245—250

Osteryoung KW, Vierling E, 1995. Conserved cell and organelle division [J]. *Nature*, 376 (6540): 473—474

Osteryoung KW, Pyke KA, 1998. Plastid division: evidence for a prokaryotically derived mechanism [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1 (6): 475—479

Pichoff S, Lutkenhaus J, 1998. Escherichia coli division inhibitor MinCD blocks septation by preventing Z-ring formation [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 18 (22): 6630—6635

Possingham JV, Saurer W, 1996. Changes in chloroplast number per cell during leaf development in spinach (*Spinacea oleracea*) [J]. *Planta*, 86: 186—194

Platt-Aloia K, Thomson WW, 1977. Chloroplast development in young sesame plants [J]. *New Phytologist*, 78: 599—605

Pichoff S, Lutkenhaus J, 2001. *Escherichia coli* division inhibitor MinCD blocks septation by preventing Z-Ring formation [J]. *Journal of Bacteriology*, 183: 6630—6635

Rothfield L, Justice S, Garcia-Lara J, 1999. Bacterial cell division [J]. *Annual Review of Genetics*, 33: 423—448

Rothfield LI, Shih YL, King G, 2001. Polar explorers: membrane proteins that determine division site placement [J]. *Cell*, 106 (1): 13—16

Rothfield L, Taghbalout A, Shih YL, 2005. Spatial control of bacterial division site placement [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (12): 959—968

Steryoung KW, Nunnari J, 2003. The division of endosymbiotic organelles [J]. *Science*, 302 (5651): 1698—1704

Shih YL, Le T, Rothfield L, 2003. Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (13): 7865—7870

Wang D, Kong DD, Wang Y *et al.*, 2003. Isolation of two plastid division ftsZs genes from *Chlamydomonas reinhardtii* and its evolutionary implication for the role of FtsZ in plastid division [J]. *Journal of Experimental Botany*, 54 (384): 1115—1116